

薬剤耐性腸管出血性大腸菌の侵淫実態と多剤耐性腸管出血性大腸菌O103の性状について

今野貴之 八柳 潤 齊藤志保子

秋田県においては1996年以降、毎年30件前後の腸管出血性大腸菌感染事例が報告されている。しかしながら、分離株の薬剤耐性に係る知見はほとんど得られていない。本研究では、これまで秋田県で分離された腸管出血性大腸菌株のうち特に分離頻度の高い血清型 O157, O26 及び O103 の計 184 株に対して、代表的な 12 種類の抗生物質について、KB ディスク法にて薬剤耐性を調査した。その結果、O157 では 21.1%、O26 では 35%、O103 では 30%が何らかの薬剤に耐性を示すことが明らかとなった。また、供試菌株のうち、2004 年に分離された腸管出血性大腸菌 O103(EC8960)は、基質拡張型 β -ラクタマーゼを産生する多剤耐性菌であることが確認された。

1 はじめに

腸管出血性大腸菌（Enterohemorrhagic *E.coli*:EHEC）による感染症は、1990 年の埼玉県の幼稚園での集団感染事例、1996 年の大阪府堺市での学校給食を原因とした大規模な集団感染事例を契機にその健康被害の重要性が認識されて以来、全国各地で集団、散発感染事例が数多く報告され、その発生は現在まで続いている。EHEC は、ベロ毒素（Verotoxin:VT）を産生する大腸菌であり、汚染された食物などを経口摂取することによって感染する。数百個の少ない菌数でも感染が成立することから、ヒトからヒトへの二次感染も問題となる。その症状は、無症候性から軽度の下痢、激しい腹痛、頻回の水様便、さらに、著しい血便とともに重篤な合併症を起こし死に至る場合もある。多くの場合、3～5 日の潜伏期において、激しい腹痛をともなう頻回の水様便の後に、血便となり、有症者の 6～7%において、下痢などの初発症状発現の数日から 2 週間以内に、溶血性尿毒症症候群、または脳症などの重症な合併症が発症する¹⁾。細菌感染症においては抗生物質による治療が基本であり、EHEC 感染症においても旧厚生省が抗生物質による治療指針を提示している²⁾。しかし、最近では薬剤耐性 EHEC の出現が報告され始め³⁾、その治療指針において EHEC 感染症の治療に推奨され、実際の治療にも汎用されているホスホマイシンに耐性を示す EHEC の報告も国内で散見されるようになってきた^{4, 5)}。しかしながら、その全体像に関しては不明であり、

秋田県においても 1996 年以降、毎年 30 件前後の感染事例が報告されているが、分離株の薬剤耐性に係る知見はほとんど得られていない。薬剤耐性菌を原因とする感染症の治療は困難を伴う場合が多く、その健康被害は多大で社会問題ともなっている。このようなことから、薬剤耐性 EHEC の出現は公衆衛生上重視すべき深刻な問題であり、その侵淫実態及びその耐性化機構の解明が必要である。このようなことから、本研究ではこれまで秋田県で分離された腸管出血性大腸菌株のうち、特に分離頻度の高い血清型 O157, O26 及び O103 の計 184 株に対して薬剤耐性の有無を調査した。また、供試菌株のうち、2004 年に分離された EHEC O103（EC8960）は、アンピシリン、セファロチン、セフォチアム、セフトキシム、セフェピム、カナマイシン、ストレプトマイシンに耐性を示す、多剤耐性 EHEC であることが確認されたことから、その耐性化機構と耐性の伝達性について調査したので報告する。

2 方法

2.1 供試菌株

1996 年から 2004 年までに秋田県において分離された EHEC 菌株のうち、特に分離頻度の高い O157（114 株）、O26（60 株）、O103（10 株）を対象とした。

2.2 薬剤感受性試験

アンピシリン、セファロチン、セフォチアム、

セフトジジム, セフトキシム, セフェピム, カナマイシン, ストレプトマイシン, テトラサイクリン, ノルフロキサシン, ホスホマイシン及びクロラムフェニコールの12種類のセンシ・ディスク (Becton-Dickinson) を用いて, Kirby-Bauer 法により行った。

2.3 最小生育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration: MIC) 測定

アンピシリン, セフトジジム, クラバン酸加セフトジジム, セフトキシム, クラバン酸加セフトキシム, カナマイシンに対する MIC を E-test (アスカ純薬) を用いて測定した。

2.4 薬剤耐性遺伝子の特定

β -ラクタマーゼ遺伝子 TEM⁶⁾, SHV⁷⁾, CTX-M⁸⁾ に特異的なプライマーを用いて, PCR 法にて薬剤耐性遺伝子を検出した。PCR 法は 94℃ 5分, 94℃ 30秒-55℃ 30秒-72℃ 30秒を 25 サイクル, 72℃ 2分の反応条件で行った。増幅断片は pGEM®-T Vector System I (Promega) を用いて TA クローニングし, BigDye (version 3.1) Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) にて反応後, 310 DNA sequencer (Applied Biosystems) を用いて DNA 配列を決定した。また, 薬剤耐性の伝播に係るインテグロン (*intI*) 及び *ISEcpI* トランスポゼース (*tnpA*) をそれぞれの遺伝子に特異的なプライマーを用いて, PCR 法にて検出した⁹⁾。

2.5 プラスミドプロファイル

EC8960 の持つプラスミドは Kado&Liu 変法によって精製した¹⁰⁾。その後, 0.7%アガロースゲルで電気泳動し, エチジウムブロマイドで染色した。

次に, サザン・ブロット法により β -ラクタマーゼ遺伝子の位置を特定した。プローブには, Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System (Amersham Biosciences) にてラベルした CTX-M の PCR 増幅断片を用いた。

2.6 プラスミドの接合伝達

プラスミドの接合伝達は液体培養法により行った¹⁰⁾。レシピエントとして *E.coli* CSH-2 (ナリジク酸耐性), ドナーとして EC8960 を LB 培地にて 37℃ で一夜培養後, 9:1 の割合で混合し

37℃ で 1 時間培養した。その後, ナリジク酸セフトキシム加 LB 寒天培地に塗抹し, 薬剤耐性の伝達性を確認した。

3 結果と考察

3.1 秋田県における薬剤耐性EHECの侵淫実態

O157 では 114 株中 24 株, O26 では 60 株中 21 株, O103 では 10 株中 3 株が何らかの薬剤に耐性を示し, その割合はそれぞれ 21.1%, 35.0%, 30.0%であった (表 1)。また, O157 ではテトラサイクリンの単剤耐性が最も多く, O26 ではアンピシリンとストレプトマイシンの 2 剤耐性が多かった。O26 ではアンピシリン, カナマイシン, ストレプトマイシン, テトラサイクリンの 4 剤耐性が 2 株, O103 ではアンピシリン, カナマイシン, ストレプトマイシン, テトラサイクリンの 4 剤耐性とアンピシリン, カナマイシン, ストレプトマイシン, テトラサイクリンに加えてセフェム系抗生物質のセファロチン, セフトチアム, セフトキシム, セフェピムに耐性を示す多剤耐性菌が検出された。

これまで EHEC の主要な薬剤耐性パターンはアンピシリン, ストレプトマイシン, テトラサイクリン, クロラムフェニコールのいずれか単剤, もしくはこれらの組み合わせたものが多いとされていた¹¹⁾。山本ら¹²⁾ は, EHEC198 株について 41 種類の薬剤耐性を調査し, アンピシリン, カナマイシン, ストレプトマイシン, テトラサイクリン, ナリジク酸, クロラムフェニコール, サルファメトキサゾール, ホスホマイシンで耐性菌の存在を確認したが, 治療に推奨されているニューキノロン系や第三代セフェムを含むセフェム系に関しては供試菌株すべてが高度感受性であったと報告している。

本報で, 秋田県の薬剤耐性 EHEC の侵淫実態を明らかにしたことで, 効果的な化学療法の指標を得ることができた。また, セフェム系抗生物質に耐性を示す多剤耐性菌の存在を明らかにしたことにより, EHEC における多剤耐性化への対策の必要性が示唆された。

表 1. 腸管出血性大腸菌の薬剤耐性パターン

ABPC:ampicillin, TC:tetracycline, SM:streptomycin, KM:kanamycin, CET:cefalotin, CTM:cefotiam, CTX:cefotaxime, CFPM:cefepime

血清型	菌株数	耐性菌数 (%)	耐性パターン(%)
O157	114	24(21.1)	TC ^r 12 (50.0)
			ABPC ^r , TC ^r 1 (4.2)
			SM ^r , TC ^r 8 (33.3)
			ABPC ^r , SM ^r 3 (12.5)
O26	60	21(35.0)	ABPC ^r , TC ^r 2 (9.5)
			SM ^r , TC ^r 1 (4.8)
			ABPC ^r , SM ^r 14 (66.7)
			KM ^r , SM ^r 1 (4.8)
			ABPC ^r , SM ^r , TC ^r 1 (4.8)
			ABPC ^r , KM ^r , SM ^r , TC ^r 2 (9.5)
O103	10	3(30)	SM ^r , TC ^r 1 (33.3)
			ABPC ^r , KM ^r , SM ^r , TC ^r 1 (33.3)
			ABPC ^r , CET ^r , CTM ^r , CTX ^r , CFPM ^r , KM ^r , SM ^r , TC ^r 1 (33.3)

3.2 多剤耐性EHEC O103(EC8960)の性状

EC8960 は、2004 年 8 月 2 日に下痢症患者より分離され、病原因子として *eaeA* と VT-1 を持つことを PCR 法にて確認した。

MIC の測定結果は、アンピシリンに 256 μ g/ml 以上、セフトキシムに 96 μ g/ml、カナマイシンに 256 μ g/ml 以上であり、セフトキシムに対する耐性は β -ラクタマーゼの阻害剤であるクラバン酸の添加によって抑制された。このことから、ク

ラス A- β -ラクタマーゼの産生が予想されたため、クラス A- β -ラクタマーゼ遺伝子に属する TEM, CTX-M, SHV の検出を試みた。その結果、耐性遺伝子として *bla*_{TEM-1} と *bla*_{CTX-M-14} を

持ち、CTX-M-14 型 ESBL を産生する EHEC



図1. β -ラクタマーゼ遺伝子の検出

M:100bp marker

であることが確認された (図 1)。また、耐性化に関わる因子としてクラス 1-インテグロンは持たないが、一部の CTX-M 型 ESBL 遺伝子の伝播に関与するとされている *ISEcpI* トランスポゼース (*tnpA*)¹³⁾ を保持していた (図 2)。

耐性遺伝子の位置を特定するため、プラスミドを精製し、0.7%アガロースゲルで電気泳動後、ラベルした CTX-M の PCR 増幅断片にてサザン・

プロット法を行った。しかしながら、プラスミドの位置には耐性遺伝子は検出されず、染色体上に検出された (図 3)。プラスミドの接合伝達においても、レシピエントに耐性は伝達しなかった。

最近になって、Ishii ら⁴⁾ と Kon ら⁵⁾ がそれぞれ血清型 O26 において ESBL 産生菌の存在を報告した。ESBL の型は、それぞれ CTX-M-18 型と CTX-M-3 型であり、いずれも R プラスミド上に存在し、他の菌に接合伝達することが確認されている。しかしながら、本研究で確認された多剤耐性 EHEC (EC8960) のように血清型

が O103 で ESBL 遺伝子を染色体上に持ち、トランスポゾンによって耐性化したと考えられる EHEC

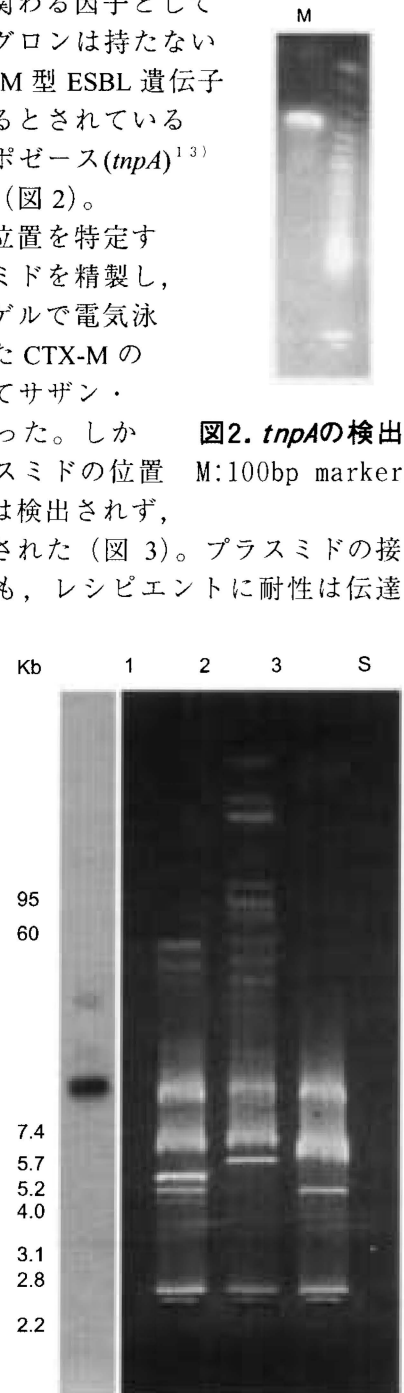


図2. *tnpA* の検出

1 and 2: *E. coli* W677 and *E. coli* V517 for size marker, 3: EC-8960, S: CTX-M Southern blot to la-

は、本研究によりはじめて確認された。

今後、本研究の成果を考慮した治療薬の選択と多剤耐性菌蔓延防止のために薬剤耐性菌の監視を継続していくことが必要である。

4 まとめ

・O157で24株(21.1%)、O26で21株(35.0%)、O103で3株(30.0%)、合計48株が何らかの抗生物質に耐性を示し、秋田県における薬剤耐性EHECの侵淫実態が解明された。

・染色体上に $bla_{CTX-M-14}$ ESBL遺伝子と耐性遺伝子の伝達に関与する $ISEcp1$ トランスポゼースを持った多剤耐性EHECが確認された。

・秋田県におけるEHECの薬剤耐性の実態を考慮した治療薬の選択と多剤耐性菌蔓延防止のために薬剤耐性菌の監視を継続していくことの必要性が示唆された。

5 文献

- 1) Karmali MA, Infection by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*, *Clin. Microb. Rev.*, **2**, 1989, 15-38.
- 2) 厚生省, 一次、二次医療機関のための腸管出血性大腸菌 (O157 等) 感染症治療の手引き (改訂版), 1997
- 3) Kim HH, Samadpour M, Grimm L, Clausen CR, Besser TE, Baylor M, Kobayashi JM, Neill MA, Schoenknecht FD, Tarr PI., Characteristics of antibiotic-resistant *Escherichia coli* O157:H7 in Washington State, 1984-1991, *J Infect Dis.*, **170**, 1994, 1606-1609
- 4) Ishii Y, Kimura S, Alba J, Shiroto K, Otsuka M, Hashizume N, Tamura K, Yamaguchi K., Extended-spectrum beta-lactamase-producing Shiga toxin gene (Stx1)-positive *Escherichia coli* O26:H11: a new concern, *J clin Microbiol.*, **43**, 2005, 1072-1075
- 5) Kon M, Kurazono T, Ohshima M, Yamaguchi M, Morita K, Watanabe N, Kanamori M, Matsushita S., Cefotaxime-resistant shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 : H11 isolated from a patient with diarrhea, *Kansenshogaku Zasshi*, **79**, 2005, 161-168
- 6) Perilli M, Dell'Amico E, Segatore B, de Massis MR, Bianchi C, Luzzaro F, Rossolini GM, Toniolo A, Nicoletti G, Amicosante G, Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases produced by nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from an Italian nationwide survey, *J Clin Microbiol.*, **40**, 2002, 611-614
- 7) Colom K, Perez J, Alonso R, Fernandez-Aranguiz A, Larino E, Cisterna R., Simple and reliable multiplex PCR assay for detection of bla_{TEM} , $bla_{(SHV)}$ and bla_{OXA-1} genes in Enterobacteriaceae, *FEMS Microbiol Lett.*, **223**, 2003, 147-151
- 8) Pagani L, Dell'Amico E, Migliavacca R, D'Andrea MM, Giacobone E, Amicosante G, Romero E, Rossolini GM., Multiple CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from a hospital in northern Italy, *J Clin Microbiol.*, **41**, 2003, 4264-4269
- 9) Bou G, Cartelle M, Tomas M, Canle D, Molina F, Moure R, Eiros JM, Guerrero A, Identification and broad dissemination of the CTX-M-14 beta-lactamase in different *Escherichia coli* strains in the northwest area of Spain, *J Clin Microbiol.*, **40**, 2002, 4030-4036
- 10) 日本細菌学会教育委員会, R プラスミドの分子遺伝学的実験法, *細菌学技術叢書*, **4**, 1983
- 11) Schroeder CM, Meng J, Zhao S, DebRoy C, Torcolini J, Zhao C, McDermott PF, Wagner DD, Walker RD, White DG, Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O26, O103, O111, O128, and O145 from animals and humans, *Emerg. Infect. Dis.*, **8**, 2002, 1409-1414
- 12) 山本達男, 脇坂紀子, 本邦における抗菌薬耐性腸管出血性大腸菌の出現状況と対策, *日本臨牀*, **56**, 1998, 2718-2729
- 13) Lartigue MF, Poirer L, Nordmann P, Diversity of genetic environment of $bla_{(CTX-M)}$ genes, *FEMS Microbiol Lett.*, **234**, 2004, 201-207